

## PREPARATION OF SEPARATION AGENT

Publication number: JP7303832

Publication date: 1995-11-21

Inventor: OGASAWARA YASUSHI; ENOMOTO NAOKI; AKANO HIROFUMI; KAWAMURA KICHIYA

Applicant: NAKANO VINEGAR CO LTD

Classification:

- international: **B01J20/24; B01J20/22; (IPC1-7): B01J20/24; G01N30/48**

- european:

Application number: JP19940123239 19940513

Priority number(s): JP19940123239 19940513

[Report a data error here](#)

### Abstract of JP7303832

**PURPOSE:**To obtain a separation agent with an excellent separation function by setting the coating rate of a silane treatment agent within a specific range to the number of moles of a reactive hydroxyl group in a porous carrier and allowing a hydrophilic polymer to bond efficiently to the functional group of a silane treatment agent, leaving a large amount of silanol group unreacted. **CONSTITUTION:**A separation agent for separating an optically active isomer is prepared by chemically bonding a hydrophilic polymer such as polysaccharide to a porous carrier such as silica gel by a silane treatment agent such as an organic silane compound. In this case, the coating rate of the silane treatment agent should be limited to 30 to 100%, preferably to 40 to 80%. Consequently, the surface of a surface treated silica gel has a high polarity as the high content of a silanol group of said silica gel is left unreacted. Therefore, the surface treated silica gel can adsorb the hydrophilic polymer such as polysaccharide in a solution, so that it is highly reactive.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-303832

(43) 公開日 平成7年(1995)11月21日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
B 0 1 J 20/24	C			
G 0 1 N 30/48	L			

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平6-123239

(22) 出願日 平成6年(1994)5月13日

(71) 出願人 390022644

株式会社中笠酢店

愛知県半田市中村町2丁目6番地

(72) 発明者 小笠原 靖

愛知県碧南市志貴町3-88

(72) 発明者 榎本 直樹

愛知県知多郡阿久比町大字植大字西案留60

(72) 発明者 赤野 裕文

愛知県半田市有脇町2-46-28

(72) 発明者 川村 吉也

愛知県江南市古知野町古渡132

(74) 代理人 弁理士 久保田 藤郎

(54) 【発明の名称】 分離剤の製造方法

(57) 【要約】

【構成】 親水性ポリマーと多孔質担体とをシラン処理剤によって化学結合させた分離剤を製造する方法において、シラン処理剤被覆率が30%以上100%以下であることを特徴とする分離剤の製造方法。

【効果】 本発明によれば、親水性ポリマーと多孔質担体とをシラン処理剤によって化学結合させた分離剤を製造する際に、未反応のシラノール基を多く残すようにシラン処理剤の量を調整することにより、親水性ポリマーをシラン処理剤の官能基に効率よく結合させ、分離能の優れた分離剤を製造することができる。したがって、この分離剤は光学活性異性体の分離のために好適に使用することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 親水性ポリマーと多孔質担体とをシラン処理剤によって化学結合させた分離剤を製造する方法において、シラン処理剤被覆率が30%以上100%以下であることを特徴とする分離剤の製造方法。

【請求項2】 親水性ポリマーが、多糖またはその誘導体である請求項1記載の分離剤の製造方法。

【請求項3】 多孔質担体が、シリカゲルである請求項1記載の分離剤の製造方法。

【請求項4】 分離剤が、光学活性異性体分離用の分離剤である請求項1記載の分離剤の製造方法。

【請求項5】 分離剤が、修飾剤を結合させたものである請求項1～4のいずれかに記載の分離剤の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、分離剤の製造方法に関する。詳しくは光学活性異性体分離用の分離剤の製造方法に関する。更に詳しくは、親水性ポリマーと多孔質担体とをシラン処理剤によって化学結合させた分離剤を製造するにあたり、多孔質担体の反応性水酸基のモル数に対して、該多孔質担体に結合したシラン処理剤のモル数の割合、すなわちシラン処理剤の被覆率を30%以上100%以下にすることを特徴とする分離剤の製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】これまで、セルロースやアミロースなどの多糖やその誘導体をシリカゲル等の多孔質担体に化学結合させた化合物は知られているが、多糖のもつ構造をなるべく壊すことなく、シリカゲル等の多孔質担体に結合させようとする場合、多糖側の架橋点をなるべく少なくする必要があった。しかし、このような目的で表面処理シリカゲルと多糖とを結合させる架橋剤を少なくしたり、あるいは特願平5-135170号明細書、同5-257538号明細書に記載されているように、多糖の還元末端のみを利用して表面処理シリカゲルに化学結合させようとした場合、当然反応性が低下し、高い結合量を得ることができないという問題点があった。特に上記特許出願書類に記載された、多糖の還元末端のみを利用して表面処理シリカゲルに化学結合させる場合、多糖側の反応部位が多糖の末端1ヶ所のみであるため、反応性が低く、高い結合量を得られないという問題点があった。高い結合量を得られないと、生成物を分離剤として利用した場合、実用的な分離が行われなかったり、分離の対象であるサンプルの負荷量が低いという問題が生じる。

【0003】そこで、本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、反応溶液中で表面処理シリカゲルと、例えば多糖を結合させる場合、表面に存在するシラン処理剤を減らしておくこと、つまり未反応のシラノール基を多く残すことにより、多糖をシラン処理剤の官能基と効率よく結合

できることを見出した。本発明はかかる知見に基づいて完成したのである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は親水性ポリマーと多孔質担体とをシラン処理剤によって化学結合させた分離剤を製造する方法において、多孔質担体の反応性水酸基のモル数に対して、シラン処理剤被覆率が30%以上100%以下であることを特徴とする分離剤の製造方法を提供するものである。

## 【0005】以下に本発明を詳細に説明する

本発明に用いられる親水性ポリマーとは、多糖、蛋白質および水溶性の合成ポリマーを意味する。ここで、多糖としては、通常、合成多糖、天然多糖及び多糖誘導体のいずれも用いられ、例えば $\alpha$ -1, 4-グルカン（アミロース）、 $\beta$ -1, 4-グルカン（セルロース）、 $\alpha$ -1, 6-グルカン（デキストラン）、 $\beta$ -1, 6-グルカン（ブスツラン）、 $\alpha$ -1, 3-グルカン、 $\beta$ -1, 3-グルカン（カードラン、シゾフィラン）、 $\alpha$ -1, 2-グルカン、 $\beta$ -1, 2-グルカン、 $\beta$ -1, 4-キトサン、 $\beta$ -1, 4-N-アセチルキトサン（キチン）、 $\beta$ -1, 4-ガラクトタン（ガラクトダン）、 $\alpha$ -1, 6-ガラクトタン、 $\beta$ -1, 2-フラクトタン（イヌリン）、 $\beta$ -2, 6-フルクトタン、 $\beta$ -1, 3-キシラン、 $\beta$ -1, 4-キシラン、 $\beta$ -1, 4-マンナン、 $\alpha$ -1, 6-マンナン、ブルラン、アガロース、澱粉等が好ましいものとして挙げられる。これら多糖の平均重合度は、通常3以上であり、上限は特に制限されないが、取扱いの点から通常は1000以下が好ましい。

【0006】蛋白質としては、BSA、リゾチームなどの水溶性蛋白質が好適に用いられる。また、水溶性の合成ポリマーとしては、例えばポリアクリル酸、ポリアルアルコール、ポリアクリルアミドやそれらの共重合体などが好適に用いられる。

【0007】次に、多孔質担体とは、多孔質無機担体及び多孔質有機担体のことであり、多孔質無機担体としては、シリカゲル、珪藻土、ヒドロキシアパタイト、アルミナ、酸化チタン、マグネシア等があり、これらの中ではシリカゲルが好ましい。なお、本発明に用いるシリカゲルの粒径は1～1000 $\mu$ m、好ましくは2～100 $\mu$ mであり、平均孔径は10 $\text{\AA}$ ～100 $\mu$ m、好ましくは5～500nmである。一方、多孔質有機担体としては、表面の極性が高い担体があり、具体的には、キチン、キトサン、セルロース等の多糖を用いた担体やビニルアルコール単位と架橋性単量体単位からなる共重合体などがある。

【0008】本発明において、親水性ポリマーとの親和性をよくするために、表面処理を行ったシリカゲルを用いることは特に好適である。表面処理は、有機シラン化合物等のシラン剤を用いたシラン化処理やプラズマ重合による方法が一般的である。シリカゲルのシラン化処理

の具体例について説明すると、シリカゲルをアミノプロピル基等の官能基を持つ有機シラン化合物で表面処理する。この際、シリカゲルの表面に存在する反応性シラノール基(reactive silanol groups)のモル数に対するシリカゲル表面を被覆するシラン処理剤のモル数の割合、すなわちシラン処理剤被覆率を30~100%、好ましくは40~80%に抑えるようにする。なお、使用したシリカゲルの表面に存在するシラノール基のうち反応性シラノール基は、Journal of Chromatography, (1991) 1 d-8d, M. OKAMOTO et alの方法に基づき約3  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  として評価した。このようにして得られた表面処理シリカゲルは未反応のシラノール基が多く残るため、極性の高い表面となり、溶液中の多糖などの親水性ポリマーを優位に吸着できるため、反応性が高くなると考えられる。

【0009】この表面処理量を抑えた表面処理シリカゲルに親水性ポリマーを結合させる方法としては、例えば特願平5-135170号明細書に記載の方法で得られたラクトン化アミロースをDMSO中に溶解してシリカゲルの表面のアミノ基とアミド結合させる方法をそのまま用いることができる。表面処理量を抑えた表面処理シリカゲルは、公知の方法によりシリカゲルに添加するシラン処理剤の量を調節することにより容易に調製できる。一般的にはシラン処理剤で表面処理する場合、シラノール基をできるだけ無くするような研究は多く行われてきたが、本発明のように、シラン処理したシリカゲルになるべく少ない架橋点で親水性ポリマーを結合させようとする場合は、今までとは逆にシラノール基をできるだけ残すようにシラン処理剤での表面処理量を減らした方が良いことが明らかとなった。

【0010】また、本発明の分離剤の親水性ポリマー部分を更に修飾することにより、分離剤としての性能を向上させることも可能となる。例えば、親水性ポリマーとして多糖を用いた場合は、特願平5-135170号明細書記載の方法により、糖水酸基を修飾することにより光学分割能を向上させることができる。なお、未反応のシラノール基の影響を無くすために、常法によりエンドキャッピング処理を施すこともできる。本発明に用いる担体の形状は特に制限されず、円筒状、角柱状、粒状、膜状などが好適な形状であり、特に多孔質膜を使用することにより、クロマト用に適した分離剤を得ることができる。

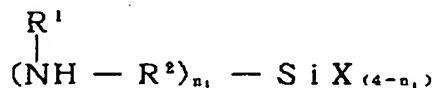
【0011】表面処理シリカゲルと親水性ポリマーとの結合様式としては、通常、エーテル、チオエーテル、エステル、アミド、ウレタン、チオウレタン、ウレア、チオウレアなどの結合のほかアミノ基のアルキレーションなどの結合様式をとることができ、使用したシラン処理剤の官能基等により適宜選択することができる。

【0012】次に、シラン処理剤としては、上記の結合様式をとりうるシラン処理剤またはその誘導体が用いら

れる。シラン処理剤は、シランカップリング剤として市販されているものやアミノ基を持つように合成されたものなど任意に用いることができる。市販されているものの中では、(1) アミノ基を含むもの、(2) ビニル基を含むもの、(3) 水酸基を含むもの、(4) ハロゲン基を含むもの、(5) メルカプタン基を含むもの、(6) イソシアネート基を含むもの、(7) エポキシ基を含むもの、(8) チオシアネート基を含むもの等の下記的一般式で示されるものが用いられるが、好ましくはアミノ基を有するものが使用され、還元末端をラクトン化した場合や還元末端を還元剤存在下で還元してアミノ化を行う場合は、第1級アミンを持つものが好ましい。また、シラン処理剤と親水性ポリマーを結合する際、ポリマー側を下記のシラン処理剤の官能基と結合するように誘導体化しておいてもよい。

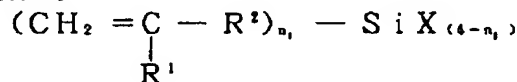
【0013】

【化1】



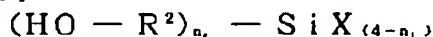
【0014】

【化2】



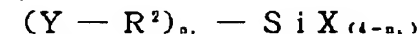
【0015】

【化3】



【0016】

【化4】



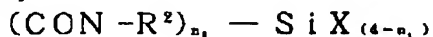
【0017】

【化5】



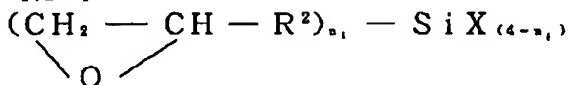
【0018】

【化6】



【0019】

【化7】



【0020】

【化8】



【0021】上記のシラン処理剤において、 $n_1$  は1~3までの整数が好ましく、 $\text{R}^1$  は水素原子または炭素数

が1~20程度のアルキル基またはそれから誘導される基を、R'は炭素数が1~20程度のアルキル基、置換アルキル基、フェニル基、置換フェニル基等が共有結合したものを示す。また、Xは少なくとも1個は炭素数が1~10までのアルコキシ基またはハロゲン原子、好ましくは塩素原子を示し、Yはハロゲン原子を示す。

【0022】本発明の方法において、親水性ポリマーと多孔質担体とをシラン処理剤によって化学結合させるには、公知の方法を適用すればよく、例えば特願平5-135170号明細書記載の方法で行うことができる。

【0023】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

#### 実施例1

##### 表面処理シリカゲルの合成①

予め活性化(180℃、2時間真空乾燥)しておいたシリカゲル(YMC社製、平均孔径30nm、粒径5μm、表面積170m<sup>2</sup>/g)3gにドライベンゼン12m<sup>3</sup>およびドライピリジン0.6m<sup>3</sup>を添加し、3-アミノプロピルトリエトキシシラン0.048m<sup>3</sup>を加えて90℃で12時間反応させた。このようにして得た表面処理シリカゲルを、メタノール、アセトン、ヘキサンで洗浄した後、60℃で2時間真空乾燥した。同様に、3\*

\*-アミノプロピルトリエトキシシランの添加量だけをそれぞれ0.1m<sup>3</sup>、0.24m<sup>3</sup>、0.48m<sup>3</sup>、1m<sup>3</sup>に変えて表面処理量の異なるシリカゲルを調製した。これら表面処理シリカゲルを3-I、3-II、3-III、3-IV、3-Vとし、パーキンエルマー2400CHN元素分析装置を用いて元素分析を行った。

##### 【0024】セルロースの結合①

セルロース(メルク社製、カラムクロマト用)10g、LiCl10gおよびDMA134m<sup>3</sup>を500m<sup>3</sup>の3ツ口フラスコ中にて80℃で溶解した。また、NaBH<sub>4</sub>CN1gをDMSO34m<sup>3</sup>に溶解した溶液を調製した。先に調製した各種表面処理シリカゲル2.9gを減圧下でよく乾燥させた後に、セルロース溶液24m<sup>3</sup>とNaBH<sub>4</sub>CN溶液4.8m<sup>3</sup>を加え、さらに氷酢酸30μlを添加し、80℃で5日間反応させた。得られたセルロース結合シリカゲルをLiCl/DMA溶液で洗浄し、メタノール、アセトン、ヘキサンで洗浄し、60℃で2時間真空乾燥した。上記の方法で得た5種類のセルロース結合シリカゲルの元素分析を行い、糖の結合量を調べ、この結果を第1表に示した。

【0025】

【表1】

第1表

シリカゲル	未処理	3-I	3-II	3-III	3-IV	3-V
表面処理(C%)	0.01	0.59	0.91	1.53	2.00	2.60
シラン処理剤 被覆率(%)	—	19	30	50	65	85
セルロース結合量 (C%)	0.13	2.22	2.53	2.46	2.13	1.80

表面処理(C%)：3-アミノプロピルトリエトキシシランで表面処理したシリカゲルの炭素含量(元素分析値)。

シラン処理剤被覆率：多孔質担体の表面に存在する全反応性OH基のモル数(ここで使用したシリカゲルの反応性シラノール基は3μmol/m<sup>2</sup>として計算)に対する、元素分析から算出された多孔質担体の表面に存在するシラン剤のモル数(この場合、元素分析のC、N比によりシラン処理剤1分子中3個のエトキシ基のうち平均で1個が残っているとした)の割合である。

セルロース結合量：アミノプロピル基を有するよう表面処理したシリカゲルに結合したセルロースの炭素含量(元素分析から算出)。

【0026】応用例1

50 実施例1で得た分離剤を0.46×25cmのステンレス

スチール製カラムにスラリー充填法にて充填した。充填装置は京都クロマト社製のPS10、PS-20オートバックリングシステムを用いた。このカラムを用いて光学分割能を評価したところ、弱い光学分割能を示した。

#### 【0027】応用例2

この例では、さらに光学分割能を向上させるため、以下の操作をした。セルロース結合量の多かった3-IIのシリカゲルを用いて合成したセルロース結合表面処理シリカゲルをドライDMA-LiC19ml、ピリジン3ml中に分散させ、この反応液に3,5-ジメチルフェニルイソシアネート2mlを添加し、80℃で14時間攪拌した後、溶液中に過剰のイソシアネート基が残存していることをIRスペクトルにおいて $2270\text{ cm}^{-1}$ にC=N間の伸縮振動を認めることにより確認した。

【0028】この反応液中の糖結合表面処理シリカゲルをテトラヒドロフラン、メタノール、アセトン、ヘキサンで洗浄し、60℃で2時間真空乾燥した。この化合物についてIRスペクトル分析および元素分析を行った結果、IRスペクトルにおいて $1710\text{ cm}^{-1}$ にカルボニル基の伸縮振動（第2級カーバミン酸エステルのC=Oの吸収）が認められ、さらに元素分析値よりCは12.25%であり、シリカゲルへの結合を確認し、この化合物

（光学分割用分離剤、シリカ孔径30nm、理論段数=6600、 $t_0=6.00$ ）をクロマト用分離剤とした。

#### 【0029】応用例3

光学分割用カラムの作製と光学分割能

応用例2で得た分離剤を $0.46 \times 25\text{ cm}$ のステンレススチール製カラムにスラリー充填法にて充填した。充填装置は京都クロマト社製のPS10、PS-20オートバックリングシステムを用いた。このカラムを用いて光学分割能を評価した。なお、高速液体クロマトグラフシステムはウォーターズ510ポンプおよび486UV検出器等を用い、溶離液はヘキサン：IPA=90：10を用い、流速 $0.5\text{ ml/min}$ 、室温で行った。

【0030】結果を第2表に示した。この表から分かるように、本発明の分離剤は $k'$ 値、 $\alpha$ 値共に高い分離特性を示した。さらに、本発明により得られた光学分割用カラムの耐溶媒性を調べるためテトラヒドロフラン（THF）溶液を流速 $1\text{ ml/min}$ で200時間流した後、光学分割能を調べたが、変化は認められず、優れた耐溶媒性を確認できた。


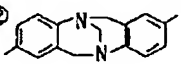
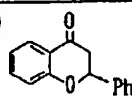

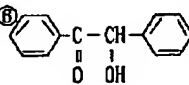
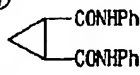
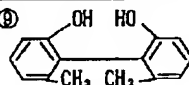
#### 【0031】

【表2】

10

20

第2表

ラセミ体	分離剤	3-II 由来	
		k <sub>1</sub>	α
① 		0.63(-)	1.59
② 		1.28(+)	1.24
③ 		1.29(-)	1.24
④ 		1.16(-)	1.16
⑤ Co(acac) <sub>3</sub>		2.01(+)	Δ
⑥ 		2.23(+)	1.32
⑦ 		1.03(+)	1.52
⑧ (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> C-CHOH-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>		1.27(+)	1.18
⑨ 		1.67(-)	2.98

Δ: 旋光度検出器で分離が認められたが、UV検出器では認められなかった。

(+): 右旋性の化合物が先に溶出したことを示す。

(-): 左旋性の化合物が先に溶出したことを示す。

#### 【0032】実施例2

##### 表面処理シリカゲルの合成②

予め活性化(180℃、2時間真空乾燥)しておいたシリカゲル(富士シリシア化学社製、平均孔径45nm、粒径5μm、表面積64m<sup>2</sup>/g)3gにドライベンゼン12mlおよびドライピリジン0.6mlを添加し、3-アミノプロピルトリエトキシシラン0.1mlを加えて90℃で12時間反応させた。このようにして得た表面処理シリカゲルをメタノール、アセトン、ヘキサンで洗浄した後、60℃で2時間真空乾燥した。同様にして、3-アミノプロピルトリエトキシシランの添加量だけをそれぞれ0.3ml、0.5ml、0.9mlに変えて表面処理量の異なるシリカゲルを調製した。これら表面処理シリカゲルを4-I、4-II、4-III、4-IVとし、パーキンエルマー2400CHN元素分析装置を用いて元素分析を行った。

#### 【0033】セルロースの結合②

セルロース(メルク社製、カラムクロマト用)10g、LiCl10gおよびDMA134mlを500mlの3ツ口フラスコ中にて80℃で溶解した。また、NaBH<sub>4</sub>CN1gをDMSO34mlに溶解した溶液を調製した。上記表面処理シリカゲルの合成②で調製した4種の表面処理シリカゲル2.9gを減圧下でよく乾燥させた後に、セルロース溶液24mlとNaBH<sub>4</sub>CN溶液4.8mlを加え、80℃で5日間反応させた。このようにして得られたセルロース結合シリカゲルをLiCl/DMA溶液で洗浄し、メタノール、アセトン、ヘキサンで洗浄し、60℃で2時間真空乾燥した。

【0034】上記の方法で得た4種類のセルロース結合シリカゲルの元素分析を行い、糖の結合量を調べた。その結果を第3表に示した。

#### 【0035】

【表3】

第3表

シリカゲル	未処理	4-I	4-II	4-III	4-IV
表面処理 (C%)	0.01	0.31	0.64	0.75	1.29
シラン処理剤 被覆率 (%)	—	27	56	65	112
セルロース結合量 (C%)	0.12	2.02	3.13	2.57	2.36

表面処理 (C%) : 3-アミノプロピルトリエトキシシランで表面処理したシリカゲルの炭素含量 (元素分析値)。

シラン処理剤被覆率 : 多孔質担体の表面に存在する全反応性OH基のモル数 (ここで使用したシリカゲルの反応性シラノール基は  $3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  として計算) に対する、元素分析から算出された多孔質担体の表面に存在するシラン剤のモル数 (この場合、元素分析のC、N比よりシラン処理剤1分子中3個のエトキシ基のうち平均で1個が残っているとした) の割合である。

セルロース結合量 : アミノプロピル基を有するよう表面処理したシリカゲルに結合したセルロースの炭素含量 (元素分析から算出)。

### 【0036】実施例3

#### 表面処理シリカゲルの合成③

予め活性化 ( $180^\circ\text{C}$ 、2時間真空乾燥) しておいたシリカゲル (富士シリシア化学社製、平均孔径  $54 \text{ nm}$ 、粒径  $5 \mu\text{m}$ 、表面積  $57 \text{ m}^2/\text{g}$ )  $3 \text{ g}$  にドライベンゼン  $12 \text{ ml}$  とドライピリジン  $0.6 \text{ ml}$  を添加し、3-(2-アミノエチルアミノプロピル) トリメトキシシラン  $0.1 \text{ ml}$  を加えて  $90^\circ\text{C}$  で12時間反応させた。得られた表面処理シリカゲルをメタノール、アセトン、ヘキサンで洗浄した後、 $60^\circ\text{C}$  で2時間真空乾燥した。同様にし、3-(2-アミノエチルアミノプロピル) トリメトキシシランの添加量だけをそれぞれ  $0.3 \text{ ml}$ 、 $0.5 \text{ ml}$ 、 $0.9 \text{ ml}$ 、 $1.5 \text{ ml}$  に変えて表面処理量の異なるシリカゲルを調製した。これら表面処理シリカゲルを5-I、5-II、5-III、5-IV、5-Vとし、元素分析を行った。

#### 【0037】ラクトン化アミロースの合成

特願平5-135170号明細書に記載した方法と同様な方法で合成したマルトペンタオースグルカノートカリウム  $0.64 \text{ g}$  とグルコース1リン酸 (G1P)  $38.5 \text{ g}$  を  $580 \text{ ml}$  の滅菌超純水、DMSO  $252 \text{ ml}$  に溶解し、pH6に調整し、その中にポテト由来の粗ホスホリラーゼを  $1320$  単位添加した後、 $45^\circ\text{C}$  で約5時間静

置した。糖鎖の伸長は、反応溶液の一部をサンプリングし、トリクロロ酢酸で酵素を失活させた後、Fiske-Subbrow法で遊離のリン酸量を定量することにより追跡した。反応溶液を湯浴中で処理して酵素を失活させ濾過した後、濃塩酸の添加によりpH1まで酸性にすることで、グルカノート塩をラクトンに変換させた。その後、100%エタノールを反応液量と同量添加し、生成糖を沈澱させた。さらに50%エタノール、100%エタノール、ジエチルエーテル (またはヘキサン) で洗浄し、 $60^\circ\text{C}$  で2時間真空乾燥して  $5.9 \text{ g}$  のラクトン化アミロースを得た。この化合物についてゲル濾過液体クロマトグラフィー分析を行い、アミロース標準試薬 (中壁酢店製) による標準曲線より算出した平均重合度は123であった。また、リン酸定量から算出した平均重合度は90であった。

【0038】前記の表面処理シリカゲルの合成③で得られた5種類の表面処理シリカゲル  $2.9 \text{ g}$  に、先に得たアミロースラクトン  $1 \text{ g}$  をドライDMSO  $9 \text{ ml}$  に溶解したものを加え、 $80^\circ\text{C}$  で12時間アミド結合させた。得られた表面処理シリカゲルをガラスフィルターG4を用いて濾過し、残渣をDMSO、メタノール、アセトン、ヘキサンで洗浄し、未結合のラクトン化アミロース等を除き、 $60^\circ\text{C}$  で2時間真空乾燥した。この5種類の糖結



合シリカゲルの元素分析を行い、糖の結合量を調べ、結果を第4表に示した。

第4表

シリカゲル	未処理	5-I	5-II	5-III	5-IV	5-V
表面処理 (C%)	0.03	0.46	0.70	0.90	1.23	1.50
シラン処理剤 被覆率 (%)	—	33	57	73	100	122
ラクトン化アミロス 結合量 (C%)	0.06	2.30	3.21	2.85	2.75	2.10

表面処理 (C%) : 3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシランで表面処理したシリカゲルの炭素含量 (元素分析値)。

シラン処理剤被覆率 : 多孔質担体の表面に存在する全反応性OH基のモル数 (ここで使用したシリカゲルの反応性シラノール基は  $3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  として計算) に対する、元素分析から算出された多孔質担体の表面に存在するシラン剤のモル数 (この場合、元素分析のC, N比よりシラン処理剤1分子中3個のメトキシ基のうち平均で1個が残っているとした) の割合である。

ラクトン化アミロス 結合量 : アミノエチルアミノプロピル基を有するよう表面処理したシリカゲルに結合したラクトン化アミロスの炭素含量 (元素分析から算出)。

【0040】

【発明の効果】本発明によれば、親水性ポリマーと多孔質担体とをシラン処理剤によって化学結合させた分離剤を製造する際に、未反応のシラノール基を多く残すようにシラン処理剤の量を調整することにより、親水性ポリ

マーをシラン処理剤の官能基に効率よく結合させ、分離能の優れた分離剤を製造することができる。したがって、この分離剤は光学活性異性体の分離のために好適に使用することができる。